

mRNA ディスプレイによる翻訳アレスト配列の大規模探索

濱野 理・土居 信英*

はじめに

リボソームにおける翻訳の速度は、バクテリアでは毎秒約20アミノ酸、真核生物では毎秒5~9アミノ酸と言われているが、常に一定の速度でリボソームがmRNA上を動いているわけではない。実際には、コドンの使用頻度¹⁾やmRNAの2次構造²⁾、連続したプロリン残基³⁾などの要因によって翻訳速度が遅くなるのが古くから知られていた。さらに、近年になって合成途上の新生ポリペプチド鎖の中には、翻訳アレスト現象と呼ばれる翻訳の一時停止を引き起こすペプチド配列が存在することが明らかとなってきた⁴⁾。このような翻訳アレスト配列の新生ペプチド鎖は、ペプチジル転移酵素中心(PTC)周辺でリボソームとの相互作用を起こすか、リボソームトンネル内壁と相互作用することによって、ペプチド転移反応や終結反応などを阻害し翻訳アレストを引き起こすと考えられている。

翻訳アレスト配列の例として、大腸菌のSecM⁵⁾や枯草菌のMifM⁶⁾は遺伝子発現の翻訳レベルでの制御、ヒトのXBP1⁷⁾は細胞内での翻訳場の局在化とストレス応答に関与する。また、特定化合物の存在下で翻訳アレストを起こすことで遺伝子発現を制御するErmCL⁸⁾やTnaC⁹⁾なども知られている。さらに、翻訳アレスト現象は翻訳速度の調節によってco-translationalなフォールディングの制御に密接に関わることが示唆されている¹⁰⁾。

mRNA ディスプレイ法の応用

このような生物学的にさまざまな機能を有する翻訳アレスト配列が、さまざまな生物種の遺伝子から発見されているが、その配列モチーフは多様であり、配列情報のみから翻訳アレストを予測することは未だ困難である。そこで筆者らは、これまでタンパク質の進化学や相互作用解析に活用してきたmRNA ディスプレイ法¹¹⁻¹³⁾を応用して、翻訳アレスト配列の試験管内選択を試みた。

mRNA ディスプレイ法とは、mRNA (遺伝子型)とそこから無細胞翻訳されたタンパク質 (表現型)とを抗生物質であるピューロマイシンを介して共有結合させる「遺伝子型と表現型の対応づけ技術」であり、1997年に、柳川¹¹⁾(当時三菱化学生命研から後に慶大に移籍)と

Szostak¹²⁾(米国ハーバード大:テロメアの発見でノーベル生理学医学賞受賞)の研究室で独立に開発された。通常のmRNA ディスプレイ法(図1A)では、終止コドンをもたないmRNAの3'末端にスパーサーを介してピューロマイシンを連結し、これを鋳型にして無細胞翻訳する。アミノアシルtRNAの3'末端アナログであるピューロマイシンは、高濃度ではリボソームのAサイトに侵入して合成途中のペプチドのC末端に結合し、全長のタンパク質合成を阻害するが、mRNAの末端に1分子程度という低い濃度では、合成途中のペプチドに結合することはなく、終止コドンを含まないためmRNAの3'末端とスパーサーの境界でリボソームが停止している間に、初めてピューロマイシンが全長タンパク質のC末端に共有結合する(図1A)。この原理を利用してmRNA-タンパク質連結分子のライブラリーを作製し、タンパク質部分の親和性を用いた試験管内選択後、mRNA部分を逆転写PCRにより増幅・解読することが可能となる。2018年にノーベル化学賞を受賞したファージディスプレイ法のライブラリーサイズは感染させる大腸菌の数に依存するため 10^6 - 10^{10} 程度であるのに対して、無細胞翻訳系を利用するmRNA ディスプレイ法では 10^{12} - 10^{15} という莫大なサイズのライブラリーを容易に扱えるという利点がある。

その後、筆者らはmRNA ディスプレイ法を一本鎖抗

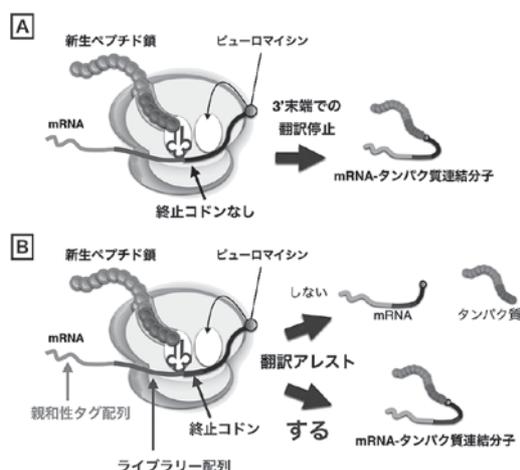


図1. mRNA ディスプレイ法の原理。(A) 通常の方法。(B) 今回の翻訳アレスト配列の探索方法。

*著者紹介 慶應義塾大学理工学部(教授) E-mail: doi@bio.keio.ac.jp

体ライブラリーの試験管内選択に応用する際、無細胞翻訳系として大腸菌由来再構成型翻訳系であるPUREシステムを用いたところ、一本鎖抗体のmRNA-タンパク質連結分子の形成効率は著しく低かった。この問題を解決するために、一本鎖抗体のC末端にランダム配列ライブラリーを融合し、リボソームの停止状態を安定化することで連結分子の形成効率を向上させる新たなペプチド配列の探索を行った¹³⁾。筆者らはこの方法が翻訳アレスト配列の探索にも応用できることに気がついた。

図1Bに示すように、共通の親和性タグ配列のC末端にライブラリー配列と終止コドンを含むmRNAライブラリーを設計する。このライブラリー部分に翻訳アレスト配列が含まれない場合には、終結因子によってタンパク質がリボソームから解離するためmRNA-タンパク質連結分子は形成されないが(図1B右上)、ライブラリー配列中に翻訳アレスト配列が含まれている場合、翻訳の一時停止中に連結分子が形成されることが期待できる(図1B右下)。親和性タグを用いて試験管内選択することで、多様なライブラリー配列から翻訳アレスト配列をコードするmRNAを回収し、次世代シーケンサーによって配列解読することで翻訳アレスト配列を大規模に同定できると期待される。実際に筆者らは本手法が動作することを確認し、STALL-seq (Selection of Translational Arrest sequences from Large Library) と命名した。

翻訳アレスト配列の大規模探索

翻訳系として大腸菌PUREシステムを、ライブラリーとして20種類のアミノ酸をランダムに22残基コードする「ランダム配列ライブラリー」と大腸菌ゲノムをランダムプライマーPCRにより断片化した「大腸菌ゲノム断片ライブラリー」の2種類のライブラリーを用いて、STALL-seqにより各ライブラリーからの翻訳アレスト配列の試験管内選択を複数ラウンド行った(図2)。

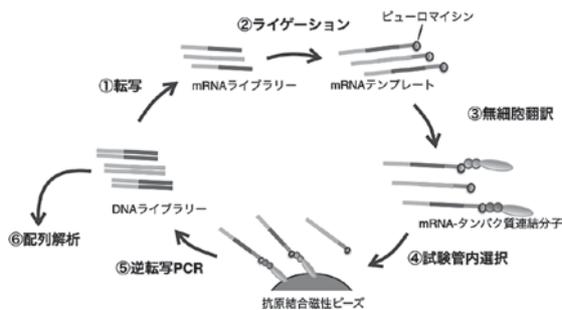


図2. STALL-seqによる翻訳アレスト配列の試験管内選択の概要

ランダム配列ライブラリー 各ラウンド後のライブラリーでmRNA-タンパク質連結分子の形成を調べた結果、8ラウンドで連結分子の形成が確認できた。そこで、クローニングにより8ラウンド後のライブラリーから複数のクローンを取得し、配列を解読した結果、特定の配列の濃縮はみられず、8ラウンド後も多様な配列が含まれていた。いくつかのクローンについて翻訳アレスト産物であるペプチジルtRNAの検出を行うことで、その大部分が*in vitro*での翻訳アレスト活性をもつことを確認した。Toe-printingアッセイによって翻訳停止位置の同定を行った結果、既知のアレスト配列とは異なる新規のアレスト配列であることが確認された。さらに、この結果を受けて作製した一部のクローンの変異体を用いた解析の結果、翻訳停止がmRNA配列ではなく翻訳後の新生ペプチド鎖によって引き起こされていることが確認された。以上の結果から、mRNAディスプレイ法が新規の翻訳アレストペプチドの探索に利用可能であることが確認できた。

現在、試験管内選択で取得した各ラウンドのDNAライブラリーを次世代シーケンサーによる配列解析に供し、ランダム配列領域の塩基配列情報を大規模に取得した。ここから翻訳後のアミノ酸配列を同定することで、濃縮率の高いアミノ酸配列の抽出やランダム領域内での位置ごとの各アミノ酸の出現頻度の算出によって、翻訳アレスト配列のモチーフの探索を試みている。

大腸菌ゲノム断片ライブラリー ランダム配列ライブラリーと比べて多様性が少ないため、ひとまず4ラウンドでクローニングを行い、クローンの翻訳アレスト活性の検証を上記と同様に行った結果、取得されたクローンの大部分は翻訳アレストを引き起こすことが確認された。そこで、1~4ラウンドのDNAライブラリーを次

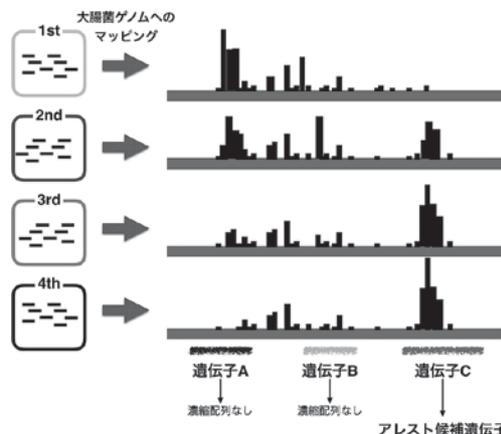


図3. 大腸菌ゲノム断片ライブラリーの大規模配列解析の概要

世代シーケンサーによる配列解読に供し、取得された配列断片を大腸菌ゲノムにマッピングすることで、試験管内選択により濃縮された大腸菌遺伝子の部分配列の同定を行った。図3に示すように、ラウンドが進むにつれてリード数のカウントが増加する遺伝子領域の中にmRNA-タンパク質連結分子の形成を促進する翻訳アレスト候補配列が含まれていることが期待できる。大腸菌全ゲノム領域のリードカウント数の各ラウンド間の濃縮率を解析した結果、大腸菌遺伝子の7割以上において、何らかの部分配列が少なくとも1度は濃縮されていることが明らかとなった。

従来法との比較

東工大の茶谷らは、大腸菌遺伝子のうち約1000個について個別にペプチジルtRNAの検出を行うことで翻訳アレスト配列を多数同定した¹⁴⁾。また、大腸菌のリボソームプロファイリング¹⁵⁾の結果も翻訳アレスト配列の情報を含むことが知られている。これら既存の手法による翻訳アレスト配列部位のデータと筆者らの濃縮配列の位置を照合した結果、よく一致する部位もあれば、まったく一致しない部位もあった。

この差の要因の一つとして、翻訳アレストごとのピューロマイシン感受性の違いがあげられる。翻訳アレスト配列のピューロマイシン感受性は、翻訳アレスト時にリボソームのAサイトが空位であるか否かを表す指標であり、Aサイトが空位であるタイプの翻訳アレストの方がピューロマイシンと反応しやすい。STALL-seqでは翻訳停止時のピューロマイシンと新生鎖の反応によって翻訳アレスト配列を選択していることから、ピューロマイシン感受性の翻訳アレスト配列のほうが濃縮されやすいと予想されるが、実際にそのような傾向が見られている。しかし、強いピューロマイシン耐性を示すSecMの翻訳アレスト配列でも個別の実験では連結分子の形成が確認されており、ピューロマイシン感受性の低い翻訳アレスト配列がまったく選別できないわけではない。

別の要因として、*in vitro*と*in vivo*の違いと、遺伝子の全長か断片かの違いがあげられる。すなわち、STALL-seqでのみ検出された新規の翻訳アレスト配列については、*in vivo*ではアレスト解除因子が存在するか、全長遺伝子の前半にアレスト解除配列が含まれている可能性

がある。そこで、今回発見した新規の翻訳アレスト配列を含む遺伝子の中から、遺伝子機能に基づいて発現が翻訳レベルで制御されると期待される遺伝子をピックアップして、種々の翻訳条件や変異体での翻訳アレスト活性の変化を検証している。これにより、候補遺伝子の翻訳アレストの生物学的意義の解明にもつながることが期待できる。

最後に、従来法がインフレームの遺伝子のみを解析しているのに対して、今回のSTALL-seqではすべてのフレームのゲノム断片を探索している点が異なる。興味深いことに、異なるフレームやアンチセンス鎖でも多数の遺伝子断片が濃縮されており、この事実は翻訳アレスト配列の進化についても新たな視点を提供している。

おわりに

これまで抗体の進化学や特殊ペプチド創薬に利用されてきたmRNAディスプレイ法が、翻訳アレスト配列の探索という基礎研究にも応用できる一例を紹介した。

謝 辞

本研究は文部科学省の科学研究費補助金・新学術領域研究「新生鎖の生物学」(15H01543および17H05674)を受けて行われたものです。本研究にご協力いただいた南雲優さん、茶谷悠平博士、田口英樹教授をはじめとする多くの共同研究者の方々に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sorensen, M. A. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **207**, 365 (1989).
- 2) Kudla, G. *et al.*: *Science*, **324**, 255 (2009).
- 3) Ude, S. *et al.*: *Science*, **339**, 82 (2013).
- 4) Ito, K. and Chiba, S.: *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 171 (2013).
- 5) Nakatogawa, H. and Ito, K.: *Cell*, **108**, 629 (2002).
- 6) Chiba, S. *et al.*: *EMBO J.*, **28**, 3461 (2009).
- 7) Yanagitani, K. *et al.*: *Science*, **331**, 586 (2011).
- 8) Vazquez-Laslop, N. *et al.*: *Mol. Cell*, **30**, 190 (2008).
- 9) Gong, F. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8997 (2001).
- 10) Kramer, G. *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 589 (2009).
- 11) Nemoto, N. *et al.*: *FEBS Lett.*, **414**, 405 (1997).
- 12) Roberts R. W. and Szostak, J. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12297 (1997).
- 13) Nagumo, Y. *et al.*: *J. Biochem.*, **159**, 519 (2016).
- 14) Chadani, Y. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E829 (2016).
- 15) Li, G. W. *et al.*: *Nature*, **484**, 538 (2012).